



Gennembrud i forståelsen af insulinfibrillering

Jensen, Minna Grønning; Vestergaard, Bente; Frøkjær, Sven; Gajhede, Michael; Flink, James M.; Van De Weert, Marco; Kastrup, Jette Sandholm Jensen; Svergun, Dmitri I.

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2007

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Jensen, M. G., Vestergaard, B., Frøkjær, S., Gajhede, M., Flink, J. M., Van De Weert, M., Kastrup, J. S. J., & Svergun, D. I. (2007). Gennembrud i forståelsen af insulinfibrillering. *Lægemiddelforskning*, 10-11.

Gennembrud i forståelsen af insulinfibrillering

Proteinlægemidler som insulin kan under produktion og opbevaring danne trådlignende fibriller, og når det sker, må lægemidlerne kasseres. Fibrillering er desuden et centralt element i sygdomsprocessen ved alvorlige sygdomme som Alzheimers syge og Type II-diabetes. En ny opdagelse kan måske løse gåden om, hvordan fibriller dannes.

Af Minna Grønning Jensen, Bente Vestergaard, Sven Frøkjær, Michael Gajhede, James M. Flink, Marco van de Weert, Jette S. Kastrup, Dmitri I. Svergun

Insulin er et lille proteinhormon, som spiller hovedrollen i reguleringen af glukoseniveauet i blodet. I insulinkrævende sukkersyge, Type I-diabetes, er de insulinproducerende celler blevet ødelagt, og patienterne behandles med gentagne injektioner af insulin eller insulinlignende proteiner. Insulin var det første protein, der blev anvendt terapeutisk allerede i 1920'erne, men meget er sket siden dengang, og nu har hver tredje nye lægemiddelansøgning et protein som det aktive stof.

Formulering af stabile proteinlægemidler er imidlertid ikke uden problemer, og en stor udfordring er at undgå, at proteinerne danner trådlignende strukturer, som kaldes fibriller. Proteinerens begrænsede stabilitet og risikoen for fibrillering medfører, at der ofte er besværlige og omkostningstunge krav til fremstilling af proteinlægemidler og ligeledes til deres opbevaring; fx skal de ofte opbevares på køl. Ud fra et terapeutisk synspunkt er tilstedeværelsen af fibriller et stort

HVAD ER EN AMYLOID FIBRIL?

Navnet amyloid blev først introduceret af Virchow i 1854 til at beskrive et aggregeret stof fundet i hjernen på en syg patient. Et proteinaggregat er ofte defineret som en ansamling af ikke-kovalent bundet protein. Amyloid betyder stivelseslignende og stammer fra den oprindelige, men fejlagtige identifikation af stoffet som stivelse (amylum på latin). På trods af misforståelsen bliver termen stadig brugt, og de trådagtige proteinaggregater kaldes amyloide fibriller.

Opbygning af insulin fibriller

En amyloid fibril er ofte opbygget af protofibriller, der snor sig om hinanden. I insulin består hver protofibril af to mindre protofilamenter, som også snor sig om hinanden. Der findes flere morfologier af insulinfibriller, og 2, 4 og 6 protofilamenter pr. fibril er blevet observeret.

problem, fordi fibrillerede proteiner er biologisk inaktive og kan forårsage et immunologisk respons ved injektionsstedet.

For at kunne designe stabile formuleringer af proteinlægemidler på et rationelt grundlag er en forbedret forståelse af fibrilleringsprocessen vigtig for at vurdere, hvordan processen kan forhindres eller hæmmes. Insulin og glukagon er konkrete eksempler på proteinlægemidler, hvor fibrillering udgør et problem.

Fibrillering og sygdomme

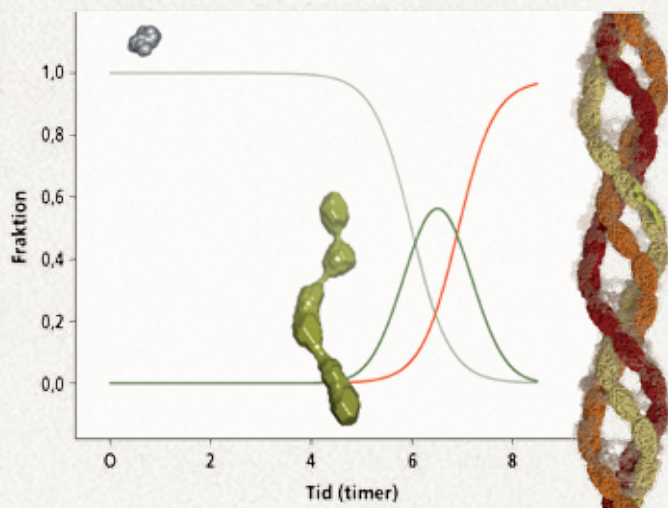
Dannelse af amyloide fibriller er observeret i forbindelse med mere end 20 ofte alvorlige sygdomme inklusive Alzheimers syge, Creutzfeldt-Jakobs syge, og Type II-diabetes, hvor et eller flere sygdomsspecifikke proteiner ændrer deres tredimensionelle foldning. Herefter begynder proteinerne at fibrillere og er ikke længere funktionelle.

I nogle af sygdommene forårsager aflejringer af enorme fibriller de kliniske symptomer, men i andre tilfælde er det stadig uvist, om fibrillerne er årsag til sygdommen eller blot er et symptom. Der er grund til at tro, at mindre aggregater end de store fibriller kan forårsage symptomerne i nogle af sygdommene. Mange studier har nemlig vist, at aggregater af få molekyler – oligomerer – som dannes under fibrilleringsprocessen, er mere giftige for cellerne end de meget større fibriller. På trods af dette spiller fibrillerne sandsynligvis alligevel en vigtig rolle, fx som reservoir for den toksiske oligomer.

Uanset om den færdige fibril eller mindre aggregater er den aktive skadevolder i sygdomsprocessen er det af afgørende betydning for rationelt design af lægemidler mod disse sygdomme, at forståelsen af fibrilleringsprocessen øges.

Nyopdaget byggeblok

Når proteiner fibrillerer, danner de trådlignende strukturer af flere tusinde proteinmolekyler. Hvorfor og hvordan dette sker, og hvordan man kan forhindre processen, er endnu



Under insulinfibrillering er der tre specier til stede. Udviklingen af deres tilstedeværelse er illustreret som deres relative volumenfraktioner som funktion af tid. I løbet af de første fire timer er der kun insulinmonomerer (grå) i opløsningen. Derefter ses et fald i monomerfraktionen fulgt af en stigning i mængden af oligomerer (grøn). Efter endnu en time er de første fibriller (orange) detekteret og efter yderligere tre timer er der kun fibriller til stede. Oligomerens struktur (grøn) er vist på relativ skala i forhold til monomeren. Fibrillen består af tre protofibriller, der snor sig om hinanden, og de er visualiseret i gul, orange og rød. En oligomer er også visualiseret på den store fibril.



Den nye forlængelsesmodel af protofilamentstrukturen med oligomeren som byggeblok: Fra venstre mod højre er det vist, hvordan protofilamentet vokser. Der er illustreret tre stadier, hvor henholdsvis 2 (venstre), 5 (midten) og 18 (højre) oligomere er gået sammen. Strukturen af protofilamentet er kompakt, og der er en central kanal, hvilket ses på protofilamentet set fra toppen.

kun forstået i ringe grad. For at opklare mekanismen bag fibrildannelsen er det vigtigt at vide hvilke strukturelle komponenter, der indgår i processen, og hvordan mængden af disse komponenter ændrer sig under forløbet. Vi har anvendt en røntgenteknik kaldet SAXS og har som de første kunnet lave en strukturel beskrivelse af de komponenter, der er til stede under en fibrillering. SAXS-teknikken er helt unikt velegnet til strukturel karakterisering af fibrilleringsprocessen.

Ud fra spredningsmønstret kan man beregne den tredimensionelle struktur af opløste proteiner. Der kan opnås information om proteinets størrelse og overordnede form, men SAXS giver ikke information om strukturen på atomart niveau.

Vore analyser gjorde det muligt at kvantificere mængden af de molekyler strukturer, der var til stede under fibrillering af insulin, og samtidig lykkedes det at lave en tredimensionel strukturel beskrivelse af dem. Fx påviste vi en tredimensionel struktur af fibrillen, hvor tre tråde kaldet protofibriller snor sig om hinanden. Desuden viste vi, at der ud over enkelte insulinmolekyler og store fibriller var en tredje specie på spil.

Denne specie blev karakteriseret som en snoet oligomer bestående af omkring seks insulinmonomere. En detaljeret beskrivelse af oligomeren er ikke tidligere opnået, og den er ekstremt vigtig for forståelsen af fibrilleringsprocessen. Vi observerede, at væksthastigheden af fibrillerne er proportional med mængden af oligomer, så jo mere oligomer der er til stede, jo hurtigere vokser fibrillerne. Denne vigtige sammenhæng mellem oligomer og fibrilvæksthastighed er aldrig tidligere blevet vist for amyloid fibrillering, og observationerne antyder, at oligomererne forlænger den voksende fibril. Heller ikke dette er tidligere blevet påvist. På den baggrund har vi foreslået en ny forlængelsesmodel for væksten af fibrilstrukturen.

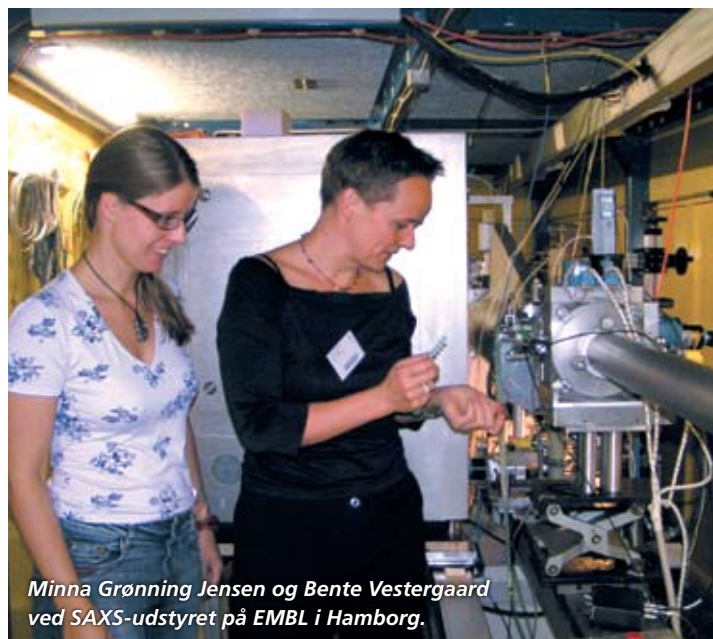
HVAD ER SAXS?

SAXS er en forkortelse for Small Angle X-ray Scattering eller røntgenbaseret småvinkelspredning på dansk. Metodens store fordel er, at processer som fibrillering kan undersøges direkte i opløsning.

SAXS er baseret på, at opløsningsmidlet og de forskellige opløste stoffer giver anledning til forskellig spredning af en fokuseret røntgenstråle, når den passerer gennem en opløsning. De opløste stoffer kan kvantificeres individuelt og karakteriseres strukturelt ved at separere deres respektive spredningsbidrag.

Ny forlængelsesmodel

Fibrillering har været genstand for intense studier i årtier, og mange modeller forsøger at beskrive mekanismen. Imidlertid kan ingen af de hidtil foreslåede mekanismer for fibrilleringsprocessen beskrive vores observerede data til fulde. Faktisk er der i de mest benyttede mekanismer end ikke mulighed for ophobning af en oligomer. I stedet beskrives fibrillering som en kimdannelsesproces, hvor et nydannet kim vokser hurtigt ved addition af monomere. Derfor har opdagelsen og karakteriseringen af den snoede oligomer bidraget med væsentlig ny indsigt i fibrilleringsprocessen. Desuden åbner opdagelsen op for nye muligheder med hensyn til at hindre fibrillering, fordi et nyt stabilt angrebspunkt er blevet identificeret. Man har ikke påvist, at insulinaggregater er giftige for celler, men det er muligt, at den snoede insulinoligomer tredimensionelt ligner de cytotoxiske oligomere, som er identificeret ved flere af de sygdomme, som er associeret med amyloid fibrillering. Før vi kan opstille en ny model for fibrilleringsmekanismen er det nødvendigt med yderligere undersøgelser af insulinfibrillering. Desuden vil vi bruge SAXS-teknikken på andre sygdomsspecifikke proteiner, fx relateret til Alzheimers syge, med henblik på at bestemme om en tilsvarende oligomer er på spil i disse fibrilleringsprocesser, og om den er cytotoxisk.



Minna Grønning Jensen og Bente Vestergaard ved SAXS-udstyret på EMBL i Hamborg.



Ph.d. Minna Grønning Jensen er postdoc ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Bente Vestergaard er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Ph.d. Michael Gajhede er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. James M. Flink er specialkemiker ved Novo Nordisk A/S.

Ph.d. Marco van de Weert er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Erhvervsforsker Jette S. Kastrup er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Dmitri I. Svergun er gruppeleder ved European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Tyskland.